

血管紧张素转换酶 II 在中毒大鼠肝脏中的作用与机制分析

李鹏飞, 郑君希, 张伟, 利雷, 张源淑*

(南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 本研究旨在观察血管紧张素转换酶 II (Angiotensin Converting Enzyme II, ACE2) 在 CCl₄ 中毒大鼠肝脏中的表达, 并探讨其参与抗损伤的作用机制。16 只 120 g 左右雄性 SD 大鼠随机分成对照组和试验组 (n=8)。对照组大鼠腹腔注射生理盐水, 试验组大鼠腹腔注射 40% CCl₄, 首次剂量为 5 mL · kg⁻¹, 以后每 3 d 1 次 (剂量为 3 mL · kg⁻¹), 每周称重 1 次, 4 周后宰杀。测定平均日增体质量、血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、白蛋白 (Alb)、总蛋白 (TP)、总胆红素 (TBIL)、血浆血管紧张素 II (Ang II) 含量、肝组织中 ACE2 含量和 Mas 受体 mRNA 的表达及 ACE2 mRNA 的分布。结果表明: 与对照组相比, 试验组大鼠平均日增体质量、血清 Alb 和 TP 含量均显著下降 ($P < 0.05$), 血清 ALT 和 AST 活性显著升高 ($P < 0.05$), 血清 TBIL 和血浆 Ang II 含量没有显著性变化, Real-time PCR 结果提示肝脏中 ACE2 和 Mas 受体的 mRNA 表达均显著上升 (3.21 ± 0.52 vs 1.03 ± 0.11 , $P < 0.01$; 1.64 ± 0.22 vs 1.02 ± 0.10 , $P < 0.05$), 原位杂交结果显示对照组大鼠 ACE2 mRNA 着色较少, 主要集中在中央静脉周围细胞, 试验组大鼠 ACE2 大量出现在病变区域、胆管周围细胞、血管及微管内皮细胞当中。本研究表明 CCl₄ 诱导的肝损伤大鼠肝脏中 ACE2 和 Mas 受体的 mRNA 表达均增加, 提示 ACE2 参与了肝脏的抗损伤过程, 其机制可能是通过激活 ACE2-Ang 1-7-Mas 轴, 减少 Ang II 的产生, 从而减轻肝损伤。

关键词: 大鼠; 肝损伤; ACE2; Ang II; Mas 受体

中图分类号: S852.33

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0353-07

Effect and Mechanism of ACE2 on Injury Liver in Rats

LI Peng-fei, ZHENG Jun-xi, ZHANG Wei, LI Lei, ZHANG Yuan-shu*

(Key Lab of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of this research was to observe the expression of ACE2 on injury liver which induced by CCl₄, and its mechanism of anti-injury. 16 SD rats was randomly divided into two groups: control group and experiment group. The rats in control group were injected stroke-physiological saline solution and the experiment group were injected 40% CCl₄, respectively. The first dosage was 5 mL · kg⁻¹, then 3 mL · kg⁻¹ every three days. Four weeks later, the activities of ALT, AST and the concentrations of albumin, total protein, total bilirubin and Ang II were detected. We also analyzed the distribution and expression of ACE2 and Mas on liver by Real-time PCR and hybridization in situ. Compared with control group, the average daily weight gain, the concentration of albumin and total protein were markedly reduced ($P < 0.05$), but the activities of ALT and AST were obviously increased ($P < 0.05$). The concentrations of TBIL and Ang II had no significantly different compared with control group. The mRNA expression levels of ACE2 and Mas receptor were increased (3.21 ± 0.52 vs 1.03 ± 0.11 , $P < 0.01$; 1.64 ± 0.22 vs

收稿日期: 2009-11-06

基金项目: 国家自然科学基金 (30871838; A200850); 大学生 SRT 项目 (0804a07)

作者简介: 李鹏飞 (1984-), 湖南郴州人, 硕士, 主要从事 ACE2 的研究, E-mail: lipengfei1102@163.com

* 通讯作者: 张源淑, E-mail: zhangyuanshu@njau.edu.cn

1.02±0.10, $P<0.05$). The distribution of ACE2 was widespread throughout cirrhotic nodules, bile duct cells and endothelial cells lining small blood vessels. The expression of ACE2 and Mas receptor on injury induced by CCl_4 in rats were increased significantly, which suggested that ACE2 may play an important role on injury liver by activating the ACE2-Ang 1-7-Mas axis to rival the effect of Ang II which could evoke injury.

Key words: rat; injury liver; ACE2; Ang II; Mas receptor

2000年,2个研究小组^[1]相继发现了肾素血管紧张素系统(Renin Angiotensin System,RAS)新的调控因子——血管紧张素转换酶 II (Angiotensin Converting Enzyme II,ACE2),它是血管紧张素转换酶 I (Angiotensin Converting Enzyme I,ACE)的同系物,由 805 个氨基酸组成,属于完整 I 型膜结合单链跨膜蛋白,分子量 120 ku。研究发现,ACE2 不能使血管紧张素 I (Angiotensin I,Ang I) 转化为血管紧张素 II (Angiotensin II,Ang II),但可以使 Ang I 代谢成血管紧张素 1-9 (Angiotensin 1-9,Ang 1-9),继而生成血管紧张素 1-7 (Angiotensin 1-7,Ang 1-7),也可以使 Ang II 直接转化为 Ang 1-7,即 ACE2 的主要代谢产物是 Ang 1-7^[2-3]。Ang 1-7 作用与 Ang II 截然相反,它可以促使缓激肽(BK)、一氧化氮(NO)、前列腺素(PG)的生成,经其特异性受体 Mas 受体可发挥扩张血管、降低血压、抗增殖和调节水电解质平衡等作用^[4]。

ACE2 参与了多种生理过程,总的研究发现 ACE2 在正常组织(心脏、肝、肾等)中表达量较低,更多地参与了一些特殊生理或病理情况下的调节。通过 ACE2 基因敲除发现小鼠易引起肺损伤,当给予重组 ACE2 则损伤大大减轻,表明 ACE2 可以直接保护肺免于被损伤^[2,5]。最新的研究发现,ACE2 在 SARS (Severe acute respiratory syndrome coronavirus)引起的肺功能衰竭中起重要作用,其能保护机体免于急性肺功能衰竭和肺水肿,而其被破坏则会引起或加重肺损伤^[3]。2007 年 Herath 等^[6]报道 ACE2 在正常人肝脏表达量很低,但在人和鼠慢性肝损伤或肝硬化中其基因和蛋白表达均增加,并伴有 ACE2 的活性增强,循环中 Ang 1-7 增多现象。Paizis 等^[7]用 RT-PCR 和 Western blotting 的方法发现肝硬化患者肝脏中 ACE2 基因和蛋白水平表达均显著升高。

这些发现提示,ACE2 在肝损伤中发挥着积极作用,但 ACE2 和 Mas 受体在肝病发生发展过程中的表达水平还不清楚,其对循环中 Ang II 和 Ang 1-

7 的调控机制也有待进一步研究。因此,本试验用 CCl_4 制造大鼠肝损伤模型,拟通过观察 ACE2 和 Mas 受体在肝损伤过程中的 mRNA 表达,并结合循环中 Ang II 和 Ang 1-7 含量变化,进一步探讨 ACE2-Ang 1-7-Mas 通路在肝损伤过程中的作用及其可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

四氯化碳;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(Alb)、总蛋白(TP)、总胆红素(TBIL)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Ang II 试剂盒购自北京北方生物技术研究所;Trizol 试剂盒购自天根生物科技(北京)有限公司;M-MLV 反转录酶购自南京生兴生物技术有限公司;SYBR Premix Ex Taq 购自南京博飞科技有限公司;ACE2、Mas 和 β -actin 的引物由上海英骏生物技术有限公司合成;ACE2 原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 主要仪器

UNIC 2100 型分光光度计(上海优尼柯仪器公司);Mikro-22R 高速冷冻离心机(德国 Andreas Hettich GmbH & CO. KG);手持式组织匀浆器(瑞士 Polytron PT1200CL);核酸浓度测定仪(德国 Eppendorf BioPhotometer);7700 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI)。

1.3 动物饲养与分组

健康成年雄性 SD 大鼠 16 只,体质量 120 g 左右(购于中国科学院上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK 沪 2007-0005),自由采食和饮水,预饲 1 周后,随机分成对照组和试验组(每组 8 只,鼠用颗粒饲料购于江苏省协同医药生物工程有限公司)。试验组大鼠腹腔注射 40% CCl_4 (对照组大鼠以生理盐水代替),首次剂量为 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,以后每 3 d 1 次(剂量为 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续 4 周,每周称重 1 次,尾静脉采血 1 次,动态观察大鼠平均日增重

及血清中 ALT 和 AST 活性的变化。

1.4 样品采集及处理

在试验第 28 天宰杀大鼠,静脉采血,分离血清和血浆,−20 °C 保存备用;迅速采集肝组织,一部分放入液氮,随后转入−80 °C 冻存备用,另一部分用 4% 多聚甲醛固定。

1.5 测定指标

1.5.1 平均日增体质量和相对肝质量 平均日增体质量 ($g \cdot d^{-1}$) = $[\sum(\text{本周体质量} - \text{上周体质量})/7]/n$; 相对肝质量 (%) = 肝质量/体质量

1.5.2 肝损伤生化指标 赖氏法测定 ALT 和 AST 活性:酶活力用卡门氏单位表示(1 卡门氏单位 = 0.482 1 IU · L⁻¹, 25 °C)

考马斯亮蓝法测定血清 TP 含量: TP 含量 ($g \cdot L^{-1}$) = $(A_{\text{测}} - A_{\text{空}})/(A_{\text{标}} - A_{\text{空}}) \times C_{\text{标}}$

溴甲酚绿法测定血清 Abl 含量: Abl 含量 ($g \cdot L^{-1}$) = $A_{\text{测}}/A_{\text{标}} \times C_{\text{标}}$

重氮法测定血清 TBIL 含量:待测样品血清 Bil 含量用 $mg \cdot dL^{-1}$ 表示

1.5.3 肝组织形态学观察 肝组织用 4% 多聚甲醛固定,常规组织切片制作。经脱水、透明、透蜡后进行石蜡包埋,5 μm 连续切片,苏木精-伊红染色,光学显微镜观察。

1.5.4 血浆 Ang II 含量的 RIA 分析 颈静脉采血 4 mL,迅速注入抗凝管中,4 °C,3 500 r · min⁻¹ 离心 10 min,分离血浆于−80 °C 保存待测。按 Ang II 放射免疫分析药盒说明书步骤进行操作。FMJ-

182 放射免疫 γ -计数器检测并获得数据。Ang II 试剂盒灵敏度:10 $pg \cdot mL^{-1}$,批内变异系数 < 10%,批间变异系数 < 15%。

1.6 肝组织 ACE2 和 Mas 受体 mRNA 的 Real-time PCR 分析

1.6.1 样品总 RNA 提取和反转录 Trizol 一步法抽提大鼠肝脏总 RNA,经 DEPC 处理后用比色法测定总 RNA 的浓度和纯度。用随机引物反转录样品总 RNA,反应体系为:总 RNA 2 μg ,2.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 随机引物,10 $mmol \cdot L^{-1}$ dNTPs,8 U RNA 酶抑制剂,100 U 反转录酶,5 μL 5 × Buffer (含 250 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris-HCl pH 8.3, 15 $mmol \cdot L^{-1}$ MgCl₂, 375 $mmol \cdot L^{-1}$ KCl, 50 $mmol \cdot L^{-1}$ DTT),总体积 25 μL 。

1.6.2 引物设计 根据 NCBI 网上大鼠 mRNA 序列 (ACE2: AY881244; Mas: NM012757; β -actin: AF122902),用 Primer 5.0 软件设计上下游引物,由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列及参数见表 1。

1.6.3 RT-PCR 反应条件 实时荧光定量 PCR 采用 Sybr Green 染料法。PCR 反应总体积为 25 μL ,包括 2 μL RT 产物、12.5 μL SYBR Green Master Mix、2 μL 目的基因引物和 8.5 μL 灭菌三蒸水,PCR 反应条件为:94 °C 预变性 1 min;94 °C 变性 20 s,62 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。各样本结果均用其相应的 β -actin 标准化,用相对定量 $\Delta\Delta CT$ 法进行数据统计。

表 1 ACE2、Mas 和 β -actin 基因引物参数

Table 1 Parameters of primer pairs for ACE2, Mas and β -actin genes

基因 Gene	基因库序列编号 GenBank accession number	引物序列 Primers sequence(5'-3')	引物方向 Orientation	产物/bp Product size
β -actin	AF122902	CCCTGTGCTGCTCACCGA	Forward	170
		ACAGTGTGGGTGACCCCGTC	Reverse	
ACE2	NM012544	AATCGTAGGCTCTGGGCTTGG	Forward	198
		TTCGATCAACTGGTTTCGGTTGTA	Reverse	
Mas	NM012757	TGACAGCCATCAGTGTGGAGA	Forward	116
		GCATGAAAGTGCCACAGGA	Reverse	

1.7 肝组织 ACE2 mRNA 原位杂交分析

试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司,试验过程参考了《组织病理学技术》。

1.8 结果处理

数据采用 SPSS 16.0 进行独立样本 t 检验和 One-Way ANOVA 方差分析,统计结果以平均数 ±

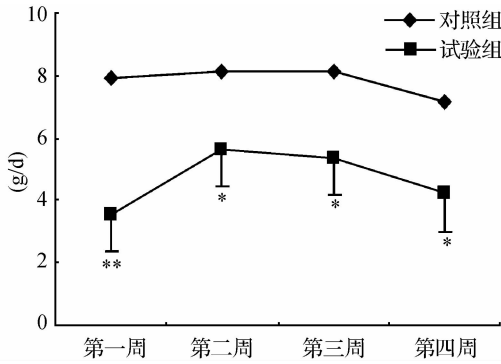
标准误 (Mean ± SE) 表示。* 表示差异显著 ($0.01 < P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

2 结果

2.1 大鼠平均日增体质量

由图 1 可以看出,与对照相比,试验组大鼠每周

平均日增体质量都显著降低 ($P < 0.05$), 由图 2 可知试验组大鼠相对肝质量提高了 47% ($P < 0.01$),



与对照组相比, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$. 下同
 Compared with control group, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$.
 The same as below

图 1 大鼠平均日增体质量
 Fig. 1 Average daily weight gain of rats

2.2 大鼠血清中 ALT、AST、Alb、TP 及 TBIL 含量

从图 3 和图 4 可以看出, 与对照组大鼠相比, 试验组大鼠第 1、2、4 周 ALT 和 AST 的活性都显著升高 ($P < 0.05$), 2 组大鼠第 3 周 AST 和 ALT 的活

这提示经 CCl_4 处理的大鼠肝脏肿大, 平均日增体质量下降。

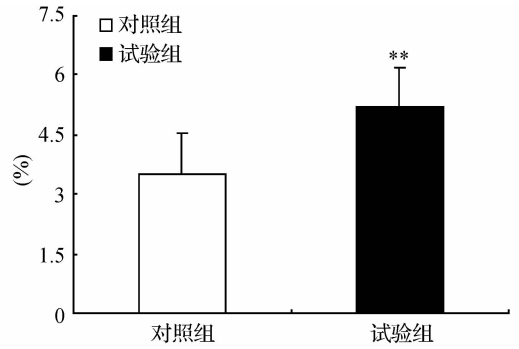


图 2 大鼠相对肝质量
 Fig. 2 Relative weight of liver in rats

性没有显著差异, 提示大鼠肝损伤过程中血清 AST 和 ALT 活性增强。由表 2 可知试验组大鼠血清 Alb 和 TP 含量显著降低 ($P < 0.05$), TBIL 含量变化无显著差异。

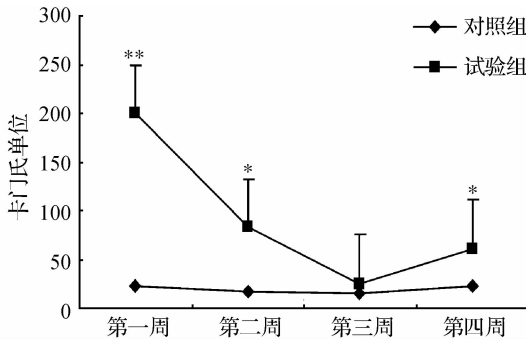


图 3 大鼠血清 ALT 活性
 Fig. 3 The activity of serum ALT in rats

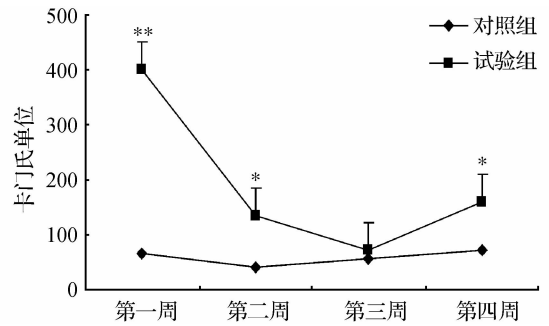


图 4 大鼠血清 AST 活性
 Fig. 4 The activity of serum AST in rats

表 2 大鼠血清白蛋白、总蛋白和总胆红素含量 (n=8)

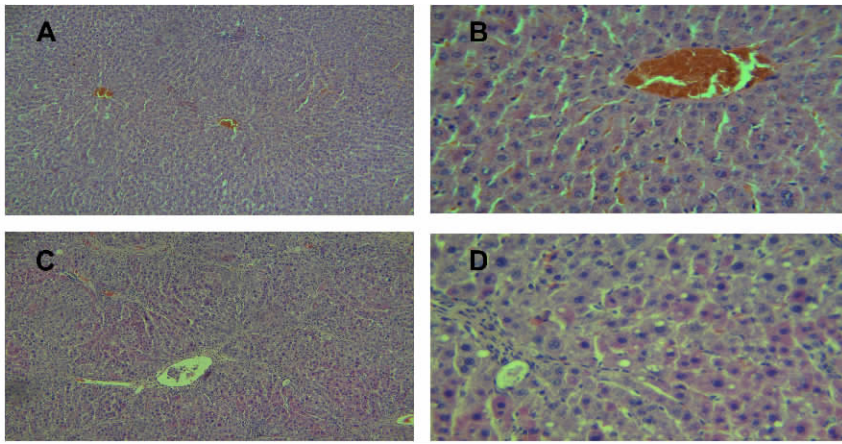
Table 2 The contents of serum Alb, TP and TBIL in rats (n=8)

组别 Group	白蛋白/(mg · mL ⁻¹) Alb	总蛋白/(mg · mL ⁻¹) TP	总胆红素/(mg · dL ⁻¹) TBIL
对照组 Control group	32.5 ± 2.22	55.5 ± 2.37	2.48 ± 0.12
试验组 Experiment group	24.7 ± 2.07 *	43.3 ± 2.84 *	2.48 ± 0.17

2.3 组织学观察结果

对照组大鼠肝脏呈鲜红色, 表面光滑, 边缘整齐, 肝细胞索呈放射状排列, 小叶中央静脉完整, 汇管区纤维结缔组织较少; 试验组大鼠肝脏体积明显

缩小, 与周围组织粘连, 中央静脉周围有不同程度的肝细胞变性、坏死, 肝窦受压变窄, 汇管区及坏死区有大量纤维结缔组织增生, 部分相互连接形成假小叶。



A(40×)、B(200×)是对照组大鼠;C(40×)、D(200×)是试验组大鼠

In sections from control group rats, A is 40×, and B is 200×; in sections from experiment group rats, C is 40×, and D is 200×

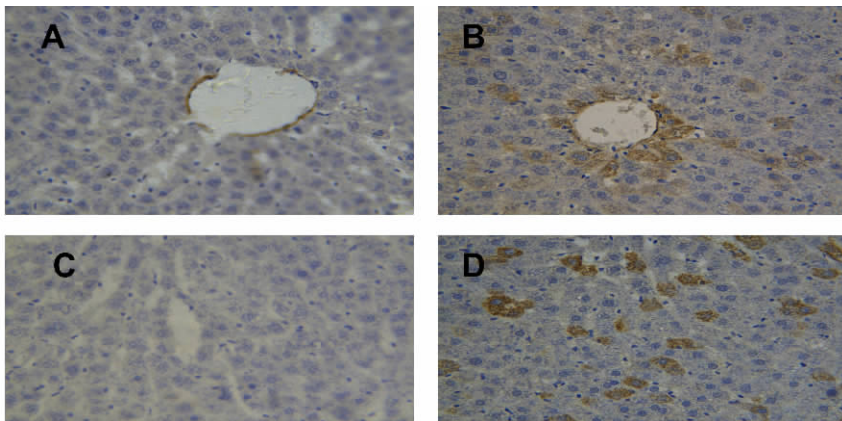
图 5 大鼠肝组织 HE 染色结果

Fig. 5 The tissue structure of liver by HE

2.4 ACE2 原位杂交结果

ACE2 原位杂交产物主要位于胞质,呈棕黄色和棕褐色,胞核呈蓝紫色。由图 6 可以看出,正常大鼠 ACE2 mRNA 着色较少,主要集中在中央静脉周

围细胞,而试验组大鼠 ACE2 mRNA 分布较广,大量出现在病变区域、胆管周围细胞、血管及微管上皮细胞中。



A 和 B 为对照组,其中 A 不含 ACE2 探针;C 和 D 为试验组,其中 C 不含 ACE2 探针

A and B are control group, and there is no probes of ACE2 in A; C and D are experiment group, and there is no probes of ACE2 in C

图 6 大鼠肝脏 ACE2 mRNA 原位杂交图(20×)

Fig. 6 The distribution of ACE2 on liver by ISH(20×)

2.5 大鼠血浆 Ang II 含量

由图 7 可以看出,与对照相比,试验组大鼠血浆中 Ang II 略有升高,但差异不显著。

2.6 大鼠肝脏中 ACE2 和 Mas 受体的 mRNA 表达结果

图 8 表示实时荧光定量 PCR 检测大鼠肝脏中 ACE2 和 Mas 受体的 mRNA 表达,与对照组相比,试验组大鼠肝脏中 ACE2 和 Mas 受体的 mRNA 的

表达均显著上升(3.21 ± 0.52 vs 1.03 ± 0.11 , $P < 0.01$; 1.64 ± 0.22 vs 1.02 ± 0.10 , $0.01 < P < 0.05$)

3 讨论

CCl_4 对肝脏毒害与其在代谢过程中产生的自由基及由自由基引发的脂质过氧化反应密切相关,

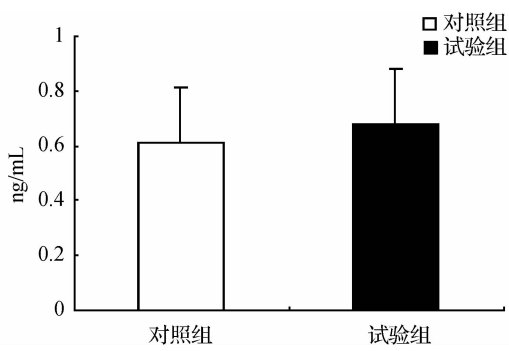


图7 大鼠血浆 Ang II 含量

Fig. 7 The content of plasma Ang II in rats

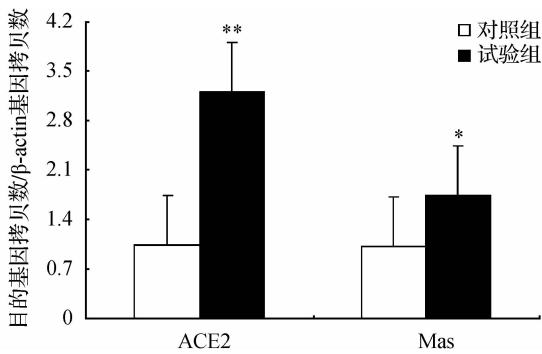


图8 大鼠肝脏 ACE2 和 Mas 受体 mRNA 的表达

Fig. 8 The expression of ACE2 and Mas receptor mRNA in liver of rats

CCl₄ 在肝微粒体细胞色素 P450 激活下生成三氯甲基(-CCl₃)继而生成自由基 CCl₃OO·, 它与肝细胞内大分子发生共价结合, 可攻击膜下不饱和脂质, 引起脂质过氧化, 导致钙内环境稳态的紊乱, 最后引起细胞死亡^[8], 肝细胞膜受损, 细胞内酶外漏, 血清中 ALT 和 AST 活性增强。血清白蛋白(Alb)主要由肝脏合成, 在生理状态下 Alb 相对恒定, 肝细胞受损时, Alb 合成下降。血清总胆红素(TBIL)增高可反映肝损伤后胆红素代谢转化和排泄障碍, 检验血清中 ALT 和 AST 活性、Alb 以及 TBIL 含量可反映肝功能损伤程度^[9]。本试验中, 经 CCl₄ 处理后, 大鼠平均日增体质量、血清 Alb 和 TP 含量均显著下降($P < 0.05$), 而相对肝质量、血清中 ALT 和 AST 活性都显著升高($P < 0.01$), 组织学观察表明: 试验组大鼠肝细胞有变性坏死现象, 肝细胞索排列紊乱, 汇管区有大量纤维结缔组织增生。平均日增体质量、血清生化指标和组织学观察三方面的结果充分证明本试验用 CCl₄ 诱导肝损伤模型成功。值得一提的是: 大鼠染毒 1 周后其血清 ALT 和 AST

的活性增强了近 10 倍, 但到第 2 周有所下降, 到第 3 周趋于正常水平, 而第 4 周的时候又显著升高, 这一趋势与大鼠平均日增体质量呈负相关, 说明 CCl₄ 诱导的肝脏是一个“损伤—修复—再损伤”的恶性循环, 最终导致肝纤维化。

大量研究表明 ACE2 在高血压、心衰竭及肾病过程中发挥着与 ACE 相反的作用, 最近还发现它在 SARS(Severe acute respiratory syndrome coronavirus)引起的肺损伤也起到保护作用^[3], 但它在肝损伤发生发展中的变化如何研究较少。Herath^[6]小组的研究发现: 肝损伤时, 肺、肾和胰脏中 ACE2 的活性并没有增加, 提示 ACE2 的分布存在组织差异性, 并推测 ACE2 的作用是局部性的参与抗损伤, 因此在研究 ACE2 的时候, 必须把组织特异性这一因素考虑进去。本研究中我们用 Real-time PCR 和原位杂交的方法发现, 与对照相比, 试验组大鼠 ACE2 mRNA 表达极显著升高($P < 0.01$), 主要分布在中央静脉周围细胞、病变区域、胆管周围细胞、血管及微管内皮细胞当中, 这与 Chandana B 小组的报道相符。

同时我们还检测了肝组织中 Mas 受体 mRNA 的表达和血浆 Ang II 含量, 结果显示: Mas mRNA 表达显著升高($P < 0.05$), 而 Ang II 的含量没有显著性变化。Ang II 可激活有丝分裂源活化蛋白激酶(mi-togen-activated protein kinases, MAPK)信号通路参与内皮细胞的分化和增殖, 它可活化内皮和血管平滑肌黄嘌呤氧化酶, 黄嘌呤又可增加 ROS 的产生, 通过消耗内皮 NO, ROS 可直接或间接损伤血管功能导致内皮机能障碍^[10]。本试验两组大鼠血浆中 Ang II 含量没有显著差异, 推测这可能是组织和血浆中 ACE2 活性增强, 加速了 Ang II 的代谢有关。之前也有类似报道^[6]: 胆管结扎大鼠肝纤维化过程当中, 第 1 周大鼠 Ang II 含量显著升高, 到第 2 周和第 3 周的时候没有变化, 而到第 4 周的时候又显著升高。

ACE2 催化 Ang II 转化生成 Ang (1-7) 的能力是其催化 Ang I 转化生成 Ang(1-9)能力的 400 倍, 是 Ang 1-7 生成酶——prolyloligopeptidase 和 prolylcarboxypeptidase 的 10 到 600 倍^[11]。Ang 1-7 通过其自身受体 Mas、血管紧张素受体 AT₂ 与内皮细胞缓激肽(bradykinin, BK)2 型受体(B2)信号途径交叉对话(crosstalk), 促使 BK 释放 NO^[12]。NO 是一种强烈的舒血管物质, 能降低全身各种血

管床的静息张力,参与肾脏排钠和肾素释放的调节,同时具有抑制血管平滑肌细胞增殖、抗血小板黏附聚集以及抗氧化应激等生理特性,在维持血管张力恒定和调节血压稳定中起着重要作用^[13]。另外,ACE2 通过 Ang 1-7 促进活性氧不敏感的 AT₁-B2 异源二聚体的形成而间接抑制 AT₁ 作用,减小 NO 的消耗,增强机体抗氧化应激的能力^[14]。

本研究发现 CCl₄ 诱导的肝损伤大鼠 ACE2 和 Mas 受体的 mRNA 表达均显著升高,说明 ACE2 在抗损伤过程中发挥着重要作用,这一作用主要通过激活 ACE2-Ang 1-7-Mas 轴而拮抗 Ang II 来实现,但 ACE2 如何被激活与调节仍然不清楚,它与 RAS 系统另一条通路 ACE-Ang II-AT₁ 轴之间的关系与作用也有待进一步研究。

参考文献:

- [1] DONOGHUE M, HSIEH F, BARONAS E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 [J]. *Circ Res*, 2000, 87(5):E1-E9.
- [2] KUBA K, IMAI Y, PENNINGER J M. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6(3):271-276.
- [3] IMAI Y, KUBA K, RAO S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure [J]. *Nature*, 2005, 436:112-116.
- [4] LI N, CHENG K, WILKINS J A, et al. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288:F353-362.
- [5] GURLEY S B, ALLRED A, LE T H, et al. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116:2218-2225.
- [6] HERATH C B, WARNER F J, LUBEL J S, et al. Upregulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis [J]. *Journal of Hepatology*, 2007, 47(3):387-395.
- [7] PAIZIS G, COOPER M E, SCHEMBRI J M, et al. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(5):1667-1676.
- [8] 张海燕,温 韬,丁淑芹,等.内质网及氧化应激在大鼠慢性肝损伤中的变化 [J]. *肝脏*, 2009, 14(1):23-25.
- [9] 姚大雷,韩在刚,贲 亮,等.暴马子皮提取物对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *延边大学医学学报*, 2009, 32(1):29-31.
- [10] ULF L, STEPHAN S, CHRISTOPH P, et al. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27:703-704.
- [11] VICKERS C, HALES P, KAUSHIK V, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme related carboxypeptidase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(17):14838-14843.
- [12] SCHMAIER A H. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction [J]. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 2003, 285:1-13.
- [13] 钟久昌,黄东阳,余细勇.高血压大鼠 ACE2 的表达及其与一氧化氮相关性分析 [J]. *高血压杂志*, 2005, 13(9):564-567.
- [14] ZHONG J C, HUANG D Y, YANG Y M, et al. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 by alltransretinoic acid in spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2004, 44:907-912.